

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ БАКТЕРИОФАГИ В ПРОФИЛАКТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ ГНИЛЬЦОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЧЕЛ

Н. И. СМИРНОВА

Как показывают исследования В. Д. Тимакова (1961) и Д. М. Гольдфарб (1961), изучение бактериофагии приобрело в последние годы большое общебиологическое значение. Бактериофаг широко используют при изучении вопросов наследственности и изменчивости, онтогенеза и филогенеза вирусов, а также в качестве тест-объекта в радиобиологических исследованиях и при изыскании лекарственных средств, обладающих антивирусным действием. Практическую ценность имеет разработка фагопрофилактики и терапии инфекционных заболеваний.

Из общего числа бактериофагов, выделенных в течение последних десятилетий, наименее изучены фаги энтомопатогенных бактерий — возбудителей европейского и американского гнильца пчел. К этим бактериофагам относятся альвейный, ларвейный и плютоновый.

Задача настоящей работы состояла в том, чтобы изучить некоторые биологические свойства указанных бактериофагов и их практическое применение в качестве профилактических и лечебных препаратов в сравнительном аспекте.

Проведенная работа показала, что альвейный, ларвейный и плютоновый бактериофаги можно выделить из больных личинок. Плютоновый фаг выделяется, кроме того, из гомологичной лизогенной культуры микробов.

При электронномикроскопическом изучении морфологии этих фагов установлено, что альвейный бактериофаг имеет форму сперматозоида (диаметр головки 70—80 *мкм* длина отростка — 160—180 *мкм* (рис. 1). Частица ларвейного бактериофага шарообразной формы. Можно предполагать наличие очень короткого хвосто-

вого отростка. Морфология плютонового бактериофага нами не изучалась.

Наиболее активными из изучаемых бактериофагов оказались альвейный и ларвейный, имевшие титр 10^{-8} , 10^{-10} после 10—12 пассажей с чувствительной микробной культурой. Вторичный рост *Bac. larvae* в фаголизатах отмечен через 72 часа, *Bac. alvei* — через 20 суток.

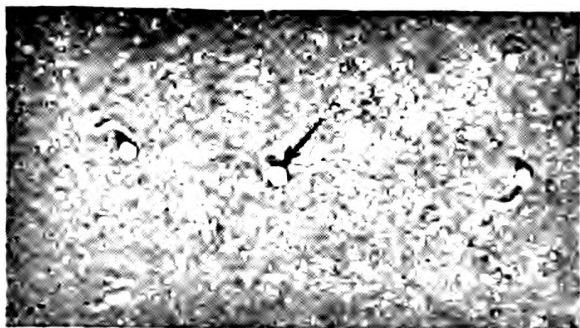


Рис. 1. Альвейный бактериофаг под электронным микроскопом. $\times 30\ 000$.

В связи с этим оказалось возможным получить производственный бактериофаг, представляющий собой прозрачную жидкость соломенно-желтого цвета без осадка и опалесценции. Возможность быстрой адаптации этих бактериофагов позволила использовать при их изготовлении местные штаммы возбудителей гнильца, выделенные из сотов с больным расплодом, полученных с пасек, где предполагалось профилактическое и лечебное применение бактериофага.

При испытании активности производственного альвейного и ларвейного бактериофага по отношению к местным штаммам *Bac. alvei* и *Bac. larvae* методом «дорожки» на плотных средах образовывались большие стерильные пятна (рис. 2, 3). Диапазон литического действия был достаточно широким: лизис бактериальных культур происходил в пределах 85—90%. Дальнейшее исследование показало, что производственный альвейный бактериофаг лизировал и гетерогенные культуры — *Bact. pluton* и *Str. apis*. В связи с этим его нельзя отне-

сти к числу бактериофагов, отличающихся строгой специфичностью.

Аналогичное явление наблюдали С. С. Казарновская (1933), Е. Т. Дружинина (1960) при изучении литиче-

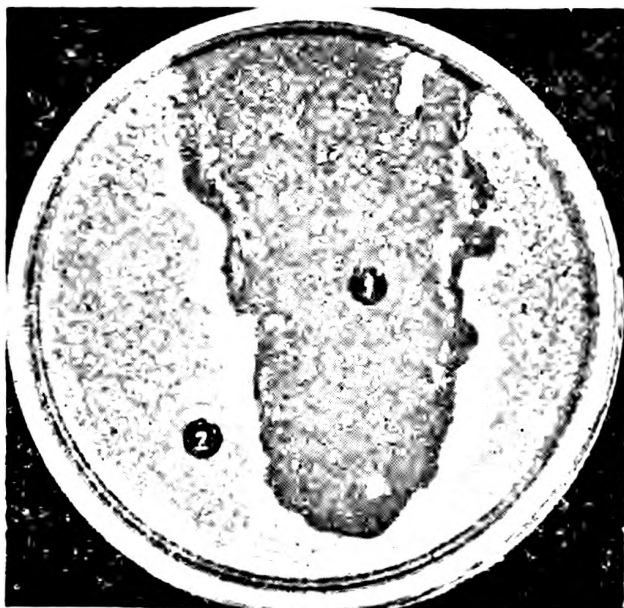


Рис. 2. Стерильное пятно (1) в агаровой культуре *Bac. alvei* (2) в бактериологической чашке.

ского действия чумного фага, а также В. Роминг и А. Бродецки (Roming, Brodetsky, 1961), выделившие из почвы бактериофаг, лизирующий микробов девяти видов.

В отличие от высокоактивных альвейного и ларвейного бактериофагов плютоновый фаг обладал низкой литической активностью: лизис бактериальной культуры происходил только на плотных средах с образованием крупных (экзогенный фаг) или мелких (лизогенный фаг) пятен (рис. 4).

При рассмотрении вопроса об устойчивости бактериофагов энтомопатогенных бактерий принимали во внимание длительность сохранения их активности в раз-

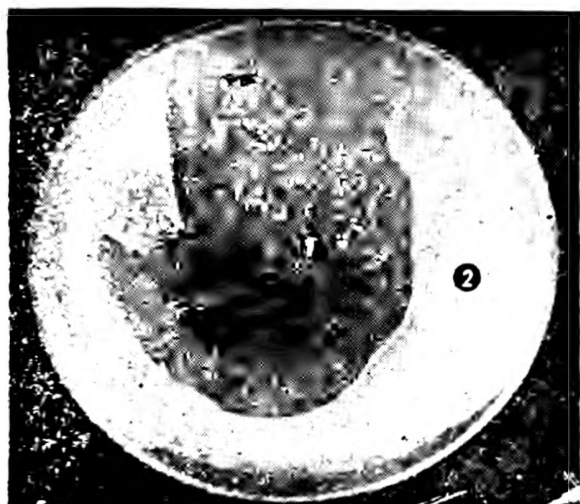


Рис. 3. Стерильное пятно (1) в агаровой культуре *Bac. larvae* (2), образовавшееся под влиянием бактериофага.



Рис. 4. Лизис (1) агаровой культуры *Bact. pluton* (2) под влиянием экзогенного плутонового фага.

личных условиях. Наиболее высокой устойчивостью отличался альвейный бактериофаг: при хранении во флаконах с резиновой пробкой и ампулах при температуре 2—4° он сохраняет активность в течение 7 лет, выдерживает высушивание при температуре —40° под вакуумом,

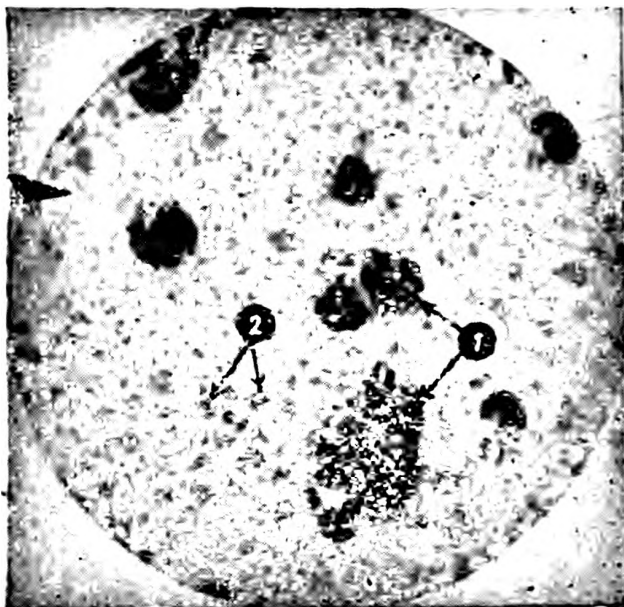


Рис. 5. Лизис колоний *Bact. pluton* под влиянием плутонового фага:

1 — крупные колонии с зонами лизиса; 2 — мелкие прозрачные, «стающие» колонии. $\times 56$.

устойчив к нагреванию до 80° и консервированию хинозолом. Ларвейный бактериофаг при аналогичных условиях сохраняет литическую способность в течение 2 лет при постепенном снижении титра до 10^{-3} , выдерживает высушивание при температуре —40°, неустойчив к нагреванию, консервированию хинозолом и фенолом. Плутоновый бактериофаг остается литически активным в течение двух месяцев.

В целях усовершенствования методов лабораторной диагностики гнильцовых заболеваний было исследовано

влияние бактериофага на изменчивость *Bac. alvei*, *Bact. pluton* и *Bac. larvae*.

При воздействии плутонового и ларвейного бактериофага на гомологическую бактериальную культуру наблюдалось образование колоний S- и R-формы, зернистых, бесцентровых и прозрачных, как бы тающих (рис. 5). Культура *Bac. alvei*, устойчивая к фагу, росла на агаре в виде слизистого наложения. Бактериофаг снижает биохимическую активность и вирулентность *Bac. alvei*. В ряде случаев отмечено выделение аспорогенных вариантов этого микроба.

В процессе электронномикроскопического исследования было установлено, что клетки *Bac. alvei* под влиянием фага увеличиваются в объеме, теряют электронномикроскопическую плотность, протоплазма их разрыхляется (рис. 6). В дальнейшем на месте микробных клеток можно видеть скопление глобулярных частиц (рис. 7).



Рис. 6. Просветление и зернистость внутренней структуры *Bac. alvei* в результате воздействия бактериофага. $\times 20\ 000$.

Эффективность профилактического и лечебного действия бактериофагов (альвейный и ларвейный) изучали на пасеках совхозов и колхозов Рязанской, Тульской, Харьковской областей, Краснодарского края, Башкирской АССР и др.

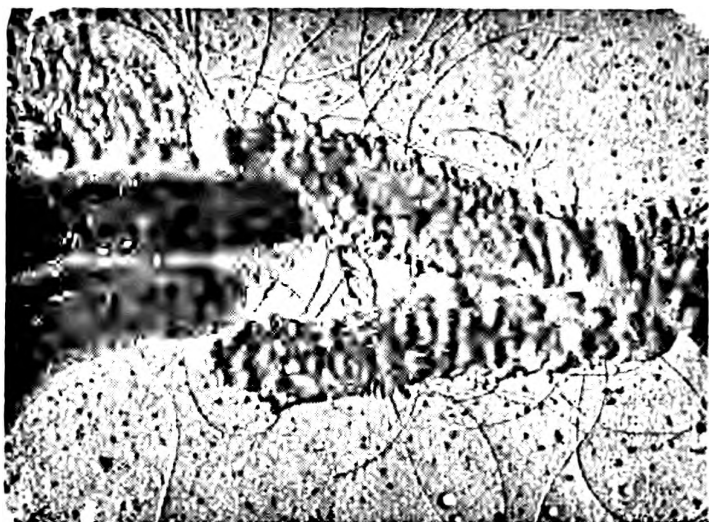


Рис. 7. Лизис клеток *Bac. alvei* под влиянием бактериофага.
× 20 000.

С целью профилактики европейского гнильца бактериофаг давали пчелам вскоре после выставки (через 2—3 недели), до появления клинических признаков гнильца на пасеках, сильно пораженных этой болезнью в прошлом сезоне. Кроме того, бактериофаг применяли и в более поздний срок — в первой половине июня. В этом случае подкормку получали здоровые семьи, находившиеся на одной пасеке с больными.

Профилактическое действие бактериофага сравнивали с действием биомицина — одного из распространенных в пчеловодной практике антибиотиков.

Бактериофаг давали в дозе 100 мл, а биомицин по 200 000 е. д. (единиц действия) на 1 л сахарного сиропа

три раза, через три дня по 0,8—1 л подкормки на семью. Контрольные семьи получали чистый сахарный сироп.

Производственное испытание профилактического действия бактериофага проведено на 540 пчелиных семьях. Полученные данные (табл. 1) показывают, что в результате фагопрофилактики заболеваемость пчелиных семей европейским гнильцом снизилась в 4—4,4 раза по сравнению с контролем и предшествующим сезоном. Бактериофаг (9,6% больных) является более эффективным профилактическим препаратом, чем биомицин (14,3% заболевших семей).

Таблица 1

Эффективность профилактического действия альвеиног
бактериофага

Препарат	Количество пчелиных семей	Заболеваемость пчелиных семей на пасеках до опыта в %	Количество больных семей после подкормки в % (1961 г.)
Альвеиный бактериофаг . . .	275	42,9	9,6
Биомицин	209	35,0	14,3
Контроль (сахарный сироп)	56	50,0	39,5

В качестве лечебных препаратов применяли как альвеиный, так и ларвеиный бактериофаг. Лечение пчелиных семей, больных европейским и американским гнильцом, проводили в течение всего летнего сезона. Бактериофаги давали по 50 (ларвеиный) — 100 мл альвеиный) на 1 л сахарного сиропа три раза через 5 дней по 0,8—1 л на семью. Учет результатов проводили через 7—10 дней после окончания курса лечения.

Лечебную эффективность бактериофагов сравнивали с действием лекарственных препаратов, рекомендованных инструкцией по борьбе с болезнями пчел, т. е. с пенициллином, норсульфазолнатрием, а также с биомицином. Всего лечили 245 пчелиных семей. Результаты представлены в табл. 2.

Как видно из этой таблицы, эффективность лечебного действия бактериофага (73,0—79,5%) приближается к лечебной эффективности биомицина, пенициллина и норсульфазолнатрия. Следовательно, бактериофаг можно использовать для лечения гнильцовых заболеваний пчел наряду с антибиотиками и норсульфазолнатрием.

Таблица 2

Лечебное действие бактериофага при европейском и американском гнильце

Препарат	Количество больных пчелиных семей	Вид гнильца	Выздоровело семей в %
Альвейный бактериофаг	72	Европейский	73,0
Ларвейный бактериофаг	52	Американский	79,5
Биомицин	106	Европейский	78,2
Пенициллин	80	»	83,4
Норсульфазолнатрий	25	Американский	84,0

Выводы

1. Альвейный, ларвейный и плутоновый бактериофаги, выделенные из личинок, больных европейским и американским гнильцом, обладают различной литической активностью (10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-1}), диапазоном действия и устойчивостью в период хранения. Альвейный бактериофаг лизирует гетерогенные микробные культуры *Bact. pluton* и *Str. apis*.

2. Бактериофаги способствуют значительной изменчивости культуральных (слизистые, бесцентровые, тающие колонии) и морфологических (увеличение размера, распад клеток) свойств возбудителей европейского и американского гнильца, что необходимо учитывать при проведении лабораторной диагностики.

3. Использование альвейного бактериофага в качестве профилактического препарата снижает заболеваемость пчел европейским гнильцом в 4,4 раза. При этом профилактическая эффективность бактериофага в 1,4 раза выше, чем биомицина.

4. Альвейный и ларвейный бактериофаги способствуют выздоровлению 73—79,5% пчелиных семей, больных европейским и американским гнильцом.

5. Альвейный и ларвейный бактериофаги можно рекомендовать производству в качестве профилактических и лечебных препаратов при гнильцовых заболеваниях пчел.